

B11

POWERED BY **Dialog**

New isolated polynucleotide from coryneform bacteria, useful for increasing production of amino acids, comprises extended genes for 1- or 6- phosphofructokinase

Patent Assignee: BATHE B; BREHME J; DEGUSSA AG; FARWICK M; HUTHMACHER K

Inventors: BATHE B; BREHME J; FARWICK M; HUTHMACHER K

Patent Family (5 patents, 98 countries)

Patent Number	Kind	Date	Application Number	Kind	Date	Update	Type
DE 10112992	A1	20020926	DE 10112992	A	20010317	200314	B
WO 2002074944	A1	20020926	WO 2002EP2830	A	20020314	200314	E
US 20030092137	A1	20030515	US 200298626	A	20020318	200335	E
AU 2002246112	A1	20021003	AU 2002246112	A	20020314	200432	E
US 6921651	B2	20050726	US 200298626	A	20020318	200549	E

Priority Application Number (Number Kind Date): DE 10112992 A 20010317

Patent Details

Patent Number	Kind	Language	Pages	Drawings	Filing Notes
DE 10112992	A1	DE	14	0	
WO 2002074944	A1	EN			
National Designated States, Original	AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH CN CO CR CU CZ DE DK DM DZ EC EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ OM PH PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TN TR TT TZ UA UG UZ VN YU ZA ZM ZW				
Regional Designated States, Original	AT BE CH CY DE DK EA ES FI FR GB GH GM GR IE IT KE LS LU MC MW MZ NL OA PT SD SE SL SZ TR TZ UG ZM ZW				
AU 2002246112	A1	EN			Based on OPI patent WO 2002074944

Alerting Abstract: DE A1

NOVELTY - Isolated polynucleotide (I) from coryneform bacteria (CB) comprising a sequence that:

1. encodes 1- and/or 6- phosphofructokinase (1- or 6-PFK); and 2. is extended by up to 700 base pairs both before the start codon and after the stop codon, is new.

DESCRIPTION - INDEPENDENT CLAIMS are also included for the following:

1. fermentative production (M2) of L-amino acids (aa), particularly lysine, by fermenting an aa-producing strain of CB in which activity of the gene for 1- and/or 6-PFK has been weakened; and 2. CB (II) in which at least one of the genes for 1- and/or 6-PFK has been weakened.

USE - CB containing (I) are useful for production of L-amino acids, specifically lysine, useful in human medicine, in the pharmaceutical and food industries and particularly in animal nutrition.

ADVANTAGE - Reducing the activity of the PFK genes improves production of amino acids.

Technology Focus:

BIOTECHNOLOGY - Preferred Nucleic Acid: The extended genes are :

1. a 2160 base pairs sequence (S3) for 1PFK and 2. a 2234 base pairs sequence (S1) for 6PFK, where the extensions, relative to known sequences, are 1-508 and 1684-2234 in (S3) and 1-531 and 1621-2160 in (S1).

Preferred Method: In (M1), the genes are weakened by inserting 300-800 base pairs fragments before the start codon and after the stop codon, specifically to produce sequences (1) and (3). Optionally the activity of other genes in the biosynthetic pathway to aa is increased, and pathways that reduce formation of aa are at least partly switched off. Reduction in PFK activity is by reducing expression or activity of the encoded enzyme. Particularly activity of at least one of the following genes is increased, particularly by overexpression: lysC (feedback-resistant aspartate kinase); dapA (dihydrodipicolinate synthase); gap (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase); pyc (pyruvate carboxylase); mqo (malate:quinone oxidoreductase); zwf (glucose-6-phosphate dehydrogenase); lysE (lysine export); zwa1 (Zwa1 protein); tpi (triose phosphate isomerase) or pgk (3-phosphoglycerate kinase). Activity of one or more of the following is reduced: pck (phosphoenolpyruvate carboxy kinase); pgi (glucose-6-phosphate isomerase); poxB (pyruvate oxidase); fda (fructose biphosphate aldolase) and zwa2 (Zwa2 protein). The preferred CB is *Corynebacterium glutamicum* and fermentation is at 20-45, preferably 25-40, (deg)C for 10-160 hours.

Preparation: Preparation of the extended sequences is not described. Once obtained, these can be introduced into host cells by gene replacement, particularly essentially conventional double cross-over homologous recombination.

International Classification (Main): C12N-015/55, C12N-009/12, C12P-013/04

(Additional/Secondary): C07H-021/04, C12N-001/21, C12N-015/54, C12N-015/74, C12P-013/08, C12P-021/02

US Classification, Issued: 435106000, 435069100, 435252300, 435320100, 536023200, 435194000, 435106000, 435115000

Original Publication Data by Authority

Australia

Publication Number: AU 2002246112 A1 (Update 200432 E)

Publication Date: 20021003

Assignee: DEGUSSA AG (DEGS)

Inventor: BREHME J HUTHMACHER K FARWICK M BATHE B

Language: EN

Application: AU 2002246112 A 20020314 (Local application)

Priority: DE 10112992 A 20010317

Related Publication: WO 2002074944 A (Based on OPI patent)

Original IPC: C12N-9/12(A) C12N-1/21(B) C12N-15/54(B) C12P-13/04(B) C12P-13/08(B)

Current IPC: C12N-9/12(A) C12N-1/21(B) C12N-15/54(B) C12P-13/04(B) C12P-13/08(B)

Germany

Publication Number: DE 10112992 A1 (Update 200314 B)

Publication Date: 20020926

****Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung coryneformer Bakterien****

Assignee: Degussa AG, 40474 Dusseldorf, DE (DEGS)

Inventor: Farwick, Mike, Dr., 33615 Bielefeld, DE Bathe, Brigitte, Dr., 33154 Salzkotten, DE Brehme, Jennifer, 33649 Bielefeld, DE Huthmacher, Klaus, Dr., 63571 Gelnhausen, DE

Language: DE (14 pages, 0 drawings)

Application: DE 10112992 A 20010317 (Local application)

Original IPC: C12N-15/55(A) C07H-21/04(B) C12N-1/21(B) C12P-13/04(B) C12P-13/08(B)

Current IPC: C12N-15/55(A) C07H-21/04(B) C12N-1/21(B) C12P-13/04(B) C12P-13/08(B)

Original Abstract: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren, bei dem man folgende Schritte durchführt: a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden coryneformen Bakterien, in denen man zumindest das für die 6-Phosphofruktokinase kodierende Gen und/oder das für die 1-Phosphofruktokinase kodierende Gen abschwächt, b) Anreicherung der gewünschten L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien und c) Isolierung der L-Aminosäure, und gegebenenfalls Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt, oder Bakterien einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure verringern.

Claim: * 1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend verlängerte für die 1-Phosphofruktokinase und/oder 6-Phosphofruktokinase kodierende Polynukleotidsequenzen, **dadurch gekennzeichnet**, dass sie jeweils vor dem Startkodon und hinter dem Stopkodon des Gens jeweils um bis zu ca. 700 Basenpaaren verlängert sind.

United States

Publication Number: US 20030092137 A1 (Update 200335 E)

Publication Date: 20030515

****Process for the preparation of L-amino acids by using coryneform bacteria****

Assignee: Farwick, Mike, Bielefeld, DE (FARW-I) Bathe, Brigitte, Salzkotten, DE (BATH-I) Brehme, Jennifer, Bielefeld, DE (BREH-I) Huthmacher, Klaus, Gelnhausen, DE (HUTH-I)

Inventor: Farwick, Mike, Bielefeld, DE Bathe, Brigitte, Salzkotten, DE Brehme, Jennifer, Bielefeld, DE Huthmacher, Klaus, Gelnhausen, DE

Agent: SMITH, GAMBRELL RUSSELL, LLP, 1850 M STREET, N.W., SUITE 800, WASHINGTON, DC, US

Language: EN

Application: US 200298626 A 20020318 (Local application)

Priority: DE 10112992 A 20010317

Original IPC: C12P-13/04(A) C07H-21/04(B) C12N-1/21(B) C12N-9/12(B) C12N-15/74(B) C12P-21/02(B)

Current IPC: C12P-13/04(A) C07H-21/04(B) C12N-1/21(B) C12N-9/12(B) C12N-15/74(B) C12P-21/02(B)

Original US Class (main): 435106

Original US Class (secondary): 43569.1 435252.3 435320.1 53623.2 435194

Original Abstract: The invention relates to a process for the preparation of L-amino acids. The process includes fermenting the coryneform bacteria producing the desired L-amino acid, in which at least the gene coding for 6-phosphofructokinase and/or the gene coding for 1-phosphofructokinase are/is attenuated, enriching the desired L-amino acid in the medium or in the cells of the bacteria, and isolating the L-amino acid. Optionally bacteria are employed in which, in addition, further genes of the biosynthetic pathway of the desired L-amino acid are enhanced, or bacteria are employed in which the metabolic pathways that diminish the formation of the desired L-amino acid are at least partly switched off.

Claim: What is claimed is: 1.**1**. An isolated polynucleotide from coryneform bacteria, comprising an elongated sequence coding for 1-phosphofructokinase and/or 6-phosph ofructokinase, wherein said sequence is elongated in front of the start codon and behind the stop codon of the gene, in each instance by up to about 700 base-pairs.[US 6921651 B2 (Update 200549 E)

Publication Date : 20050726

Process for the preparation of amino acids by using coryne form bacteria with attenuated 1-phosphofructokinase activity

Assignee : Degussa AG, Dusseldorf, DE (DEGS) Farwick, Mike, Bielefeld, DE Residence: DE
Nationality: DE Bathe, Brigitte, Salzkotten, DE Residence: DE Nationality: DE Brehme, Jennifer,
Bielefeld, DE Residence: DE Nationality: DE Huthmacher, Klaus, Gelnhausen, DE Residence: DE
Nationality: DE

Inventor: Farwick, Mike, Bielefeld, DE Residence: DE Nationality: DE Bathe, Brigitte, Salzkotten, DE
Residence: DE Nationality: DE Brehme, Jennifer, Bielefeld, DE Residence: DE Nationality: DE
Huthmacher, Klaus, Gelnhausen, DE Residence: DE Nationality: DE

Agent: Smith, Gambrell Russell

Language: EN

Application: US 200298626 A 20020318 (Local application)

Priority: DE 10112992 A 20010317

Original IPC: C12P-13/04(A)

Current IPC: C12P-13/04(A)

Original US Class (main): 435106

Original US Class (secondary): 435115

Original Abstract: The invention relates to a process for the preparation of L-amino acids. The process includes fermenting the coryneform bacteria producing the desired L-amino acid, in which at least the gene coding for 6-phosphofructokinase and/or the gene coding for 1-phosphofructokinase are/is attenuated, enriching the desired L-amino acid in the medium or in the cells of the bacteria, and isolating the L-amino acid. Optionally bacteria are employed in which, in addition, further genes of the biosynthetic pathway of the desired L-amino acid are enhanced, or bacteria are employed in which the metabolic pathways that diminish the formation of the desired L-amino acid are at least partly switched off.

Claim: 1.1. A process for the fermentative preparation of L-amino acids in ~Corynebacterium glutamicum~ bacteria, comprising: * a) fermenting the bacteria, in which at least the gene encoding 1-phosphofructokinase is eliminated by a method of mutagenesis selected from the group consisting of insertion of at least one base pair, deletion of at least one base pair, and transition or transversion mutagenesis with incorporation of a nonsense mutation, in a medium and for a time suitable for the formation of the L-amino acids; and * b) accumulating the produced L-amino acids in medium or in the cells of the bacteria.

WIPO

Publication Number: WO 2002074944 A1 (Update 200314 E)

Publication Date: 20020926

****PROCESS FOR THE PREPARATION OF L-AMINO ACIDS BY USING CORYNEFORM BACTERIA PROCEDE DE PREPARATION D'ACIDES AMINES L A L'AIDE DE BACTERIES CORYNEFORMES****

Assignee: DEGUSSA AG, Bennigsenplatz 1, 40474 Dusseldorf, DE Residence: DE Nationality: DE (DEGS)

Inventor: FARWICK, Mike, Gustav-Adolf-Strasse 11, 33615 Bielefeld, DE BATHE, Brigitte, Twieten 1, 33154 Salzkotten, DE BREHME, Jennifer, Kastanienstrasse 10, 33649 Bielefeld, DE HUTHMACHER, Klaus, Larchenweg 18, 63571 Gelnhausen, DE
Language: EN

Application: WO 2002EP2830 A 20020314 (Local application)

Priority: DE 10112992 A 20010317

Designated States: (National Original) AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH CN CO CR CU CZ DE DK DM DZ EC EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ OM PH PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TN TR TT TZ UA UG UZ VN YU ZA ZM ZW (Regional Original) AT BE CH CY DE DK EA ES FI FR GB GH GM GR IE IT KE LS LU MC MW MZ NL OA PT SD SE SL SZ TR TZ UG ZM ZW

Original IPC: C12N-9/12(A) C12N-1/21(B) C12N-15/54(B) C12P-13/04(B) C12P-13/08(B)

Current IPC: C12N-9/12(A) C12N-1/21(B) C12N-15/54(B) C12P-13/04(B) C12P-13/08(B)

Original Abstract: The invention relates to a process for the preparation of L-amino acids, wherein the following steps are implemented: a) fermentation of the coryneform bacteria producing the desired L-amino acid, in which at least the gene coding for 6-phosphofructokinase and/or the gene coding for 1-phosphofructokinase are/is attenuated, b) enrichment of the desired L-amino acid in the medium or in the cells of the bacteria, and c) isolation of the L-amino acid, and optionally bacteria are employed in which, in addition, further genes of the biosynthetic pathway of the desired L-amino acid are enhanced, or bacteria are employed in which the metabolic pathways that diminish the formation of the desired L-amino acid are at least partly switched off. L'invention concerne un procede de preparation d'acides amines L au cours duquel les etapes suivantes sont realisees: a) fermentation de bacteries coryneformes qui produisent l'acide amine L voulu, au cours de laquelle au moins le gene codant pour 6-phosphofructokinase et/ou le gene codant pour 1-phosphofructokinase sont/est atteneue(s), b) enrichissement du milieu ou des cellules des bacteries en acide amine L et c) isolation de l'acide amine L, et eventuellement des bacteries, dans lesquelles d'autres genes de la voie de biosynthese de l'acide amine L voulu sont aussi renforces, sont utilisees, ou des bacteries, dans lesquels les voies metaboliques qui reduisent la formation de l'acide amine L voulu sont au moins partiellement eliminees, sont utilisees.

Derwent World Patents Index

© 2006 Derwent Information Ltd. All rights reserved.

Dialog® File Number 351 Accession Number 13061839



①⑨ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 101 12 992 A 1**

⑳ Aktenzeichen: 101 12 992.0
㉔ Anmeldetag: 17. 3. 2001
㉕ Offenlegungstag: 26. 9. 2002

⑤① Int. Cl.⁷:
C 12 N 15/55
C 12 N 1/21
C 07 H 21/04
C 12 P 13/04
C 12 P 13/08
// (C12N 1/21,C12R
1:15)(C12P 13/04,
C12R 1:15)(C12P
13/08,C12R 1:15)

DE 101 12 992 A 1

⑦① Anmelder:
Degussa AG, 40474 Düsseldorf, DE

⑦② Erfinder:
Farwick, Mike, Dr., 33615 Bielefeld, DE; Bathe,
Brigitte, Dr., 33154 Salzkotten, DE; Brehme,
Jennifer, 33649 Bielefeld, DE; Huthmacher, Klaus,
Dr., 63571 Gelnhausen, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤④ Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung coryneformer Bakterien

⑤⑦ Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren, bei dem man folgende Schritte durchführt:

- a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden coryneformen Bakterien, in denen man zumindest das für die 6-Phosphofruktokinase kodierende Gen und/oder das für die 1-Phosphofruktokinase kodierende Gen abschwächt,
 - b) Anreicherung der gewünschten L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien und
 - c) Isolierung der L-Aminosäure,
- und gegebenenfalls Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt, oder Bakterien einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure verringern.

DE 101 12 992 A 1

Beschreibung

[0001] Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, unter Verwendung coryneformer Bakterien, in denen das pfkA-Gen kodierend für die 6-Phosphofruktokinase und/oder das pfkB-Gen kodierend für die 1-Phosphofruktokinase abgeschwächt ist.

Stand der Technik

[0002] L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung Anwendung.

[0003] Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere *Corynebacterium glutamicum* hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellungsverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie zum Beispiel die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

[0004] Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite wie zum Beispiel das Lysin-Analogon S-(2-Aminoethyl)-Cystein oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und L-Aminosäuren produzieren.

[0005] Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung L-Aminosäure produzierender Stämme von *Corynebacterium glutamicum* eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die L-Aminosäure-Produktion untersucht.

Aufgabe der Erfindung

[0006] Die Erfinder haben sich die Aufgabe gestellt, neue Grundlagen für verbesserte Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, mit coryneformen Bakterien bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

[0007] Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt, sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin gemeint. Besonders bevorzugt ist L-Lysin.

[0008] Wenn im Folgenden L-Lysin oder Lysin erwähnt werden, sind damit nicht nur die Basen, sondern sind auch die Salze wie z. B. Lysin-Monohydrochlorid oder Lysin-Sulfat gemeint.

[0009] Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen man zumindest die für die 6-Phosphofruktokinase kodierende Nukleotidsequenz und/oder die für die 1-Phosphofruktokinase kodierende Nukleotidsequenz abschwächt, insbesondere ausschaltet oder auf niedrigem Niveau exprimiert.

[0010] Gegenstand dieser Erfindung ist weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren in dem folgende Schritte durchgeführt werden:

- a) Fermentation der L-Aminosäure produzierenden coryneformen Bakterien, in denen zumindest die für die 6-Phosphofruktokinase kodierende Nukleotidsequenz und/oder die für die 1-Phosphofruktokinase kodierende Nukleotidsequenz abgeschwächt, insbesondere ausgeschaltet oder auf niedrigem Niveau exprimiert wird;
- b) Anreicherung der L-Aminosäuren im Medium oder in den Zellen der Bakterien; und
- c) Isolierung der gewünschten L-Aminosäuren, wobei gegebenenfalls Bestandteile der Fermentationsbrühe und/oder der Biomasse in Anteilen oder in ihren Gesamtmengen im Endprodukt verbleiben.

[0011] Die eingesetzten Stämme produzieren bevorzugt bereits vor der Abschwächung des für die 6-Phosphofruktokinase kodierenden pfkA-Gens und/oder des für die 1-Phosphofruktokinase kodierenden pfkB-Gens L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin.

[0012] Bevorzugte Ausführungsformen finden sich in den Ansprüchen.

[0013] Der Begriff "Abschwächung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor verwendet oder ein Gen bzw. Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer niedrigen Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Gen oder Enzym (Protein) inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

[0014] Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können Aminosäuren aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung *Corynebacterium* handeln. Bei der Gattung *Corynebacterium* ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

[0015] Geeignete Stämme der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere der Art *Corynebacterium glutamicum*, sind besonders die bekannten Wildtypstämme *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032

Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806
 Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870
 Corynebacterium melassecola ATCC17965
 Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539
 Brevibacterium flavum ATCC14067 5
 Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 und
 Brevibacterium divaricatum ATCC14020
 und daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende Mutanten bzw. Stämme
 wie beispielsweise die L-Lysin produzierenden Stämme
 Corynebacterium glutamicum FERM-P 1709 10
 Brevibacterium flavum FERM-P 1708
 Brevibacterium lactofermentum FERM-P 1712
 Corynebacterium glutamicum FERM-P 6463
 Corynebacterium glutamicum FERM-P 6464 und
 Corynebacterium glutamicum DSM 5715. 15

[0016] Es wurde gefunden, daß coryneforme Bakterien nach Abschwächung des für die 6-Phosphofruktokinase (EC: 2.7.1.11) kodierenden Gens und/oder des für die 1-Phosphofruktokinase (EC 2.7.1.56) kodierenden Gens in verbesserter Weise L-Aminosäuren produzieren.

[0017] Die Nukleotidsequenz des für die 6-Phosphofruktokinase von Corynebacterium glutamicum kodierenden Gens kann der Patentanmeldung WO 01/00844 unter dem Identification Code RXA00206 als SEQ ID No. 53 entnommen werden. 20

[0018] Die Nukleotidsequenz des für die 1-Phosphofruktokinase von Corynebacterium glutamicum kodierenden Gens kann der Patentanmeldung WO 01/00844 unter dem Identification Code RXA01882 als SEQ ID No. 57 entnommen werden.

[0019] Ebenfalls sind die Nukleotidsequenzen in der Genbank unter der Accession Number AX064927 bzw. AX064931 hinterlegt. 25

[0020] Die beanspruchten Nukleotidsequenzen der für die 1-Phosphofruktokinase und für die 6-Phosphofruktokinase kodierenden Gene, dargestellt in den SEQ ID No. 3 bzw. SEQ ID No. 1, sind gegenüber den aus dem Stand der Technik bekannten Sequenzen um jeweils bevorzugt bis zu 700 Basenpaare vor dem Startkodon und hinter dem Stopkodon des Gens verlängert. 30

[0021] Die Verlängerungen gegenüber der aus dem Stand der Technik bekannten Sequenz bestehen in der SEQ ID No. 3 aus den Basenpaaren 1 bis 508 bzw. 1684 bis 2234.

[0022] In SEQ ID No. 1 bestehen die Verlängerungen gegenüber der aus dem Stand der Technik bekannten Sequenz aus den Basenpaaren 1 bis 531 bzw. 1621 bis 2160.

[0023] Die Aminosäuresequenzen der dazugehörigen Genprodukte sind in SEQ ID No. 4 bzw. SEQ ID No. 2 dargestellt. 35

[0024] Es wurde gefunden, daß mit Hilfe der so bereitgestellten verlängerten Sequenzen an sich bekannte Verfahren zur Abschwächung besonders erfolgreich eingesetzt werden können.

[0025] Eine solches Verfahren ist die Methode des Genaustausches ("gene replacement"). Dabei wird eine Mutation wie z. B. eine Deletion, Insertion oder Basenaustausch in dem interessierenden Gen in-vitro hergestellt. Das hergestellte Allel wird wiederum in einen für C. glutamicum nicht replikativen Vektor kloniert und dieser anschließend durch Transformation oder Konjugation in den gewünschten Wirt von C. glutamicum überführt. Nach homologer Rekombination mittels eines ersten, Integration bewirkenden "cross-over"-Ereignisses und eines geeigneten zweiten, eine Exzision bewirkenden "cross-over"-Ereignisses im Zielgen bzw. in der Zielsequenz erreicht man den Einbau der Mutation bzw. des Allels. Diese Methode wurde beispielsweise in EP: 00110021.3 verwendet, um das secG-Gen von C. glutamicum auszuschalten. 40

[0026] Die Verlängerung der eingesetzten Sequenzen ist nicht auf 600 Basenpaare vor dem Startkodon und hinter dem Stopkodon beschränkt. Sie liegt bevorzugt im Bereich von 300 bis 700 Basenpaaren, kann aber auch bis zu 800 Basenpaaren betragen. Die Verlängerungen können auch unterschiedliche Mengen an Basenpaaren enthalten.

[0027] Die in den angegebenen Textstellen beschriebenen Sequenzen kodierend für die 6-Phosphofruktokinase bzw. 1-Phosphofruktokinase, können erfindungsgemäß verwendet werden. Weiterhin können Allele der 6-Phosphofruktokinase bzw. 1-Phosphofruktokinase verwendet werden, die sich aus der Degeneriertheit des genetischen Codes oder durch funktionsneutrale Sinnmutationen ("sense mutations") ergeben. 50

[0028] Zur Erzielung einer Abschwächung können entweder die Expression des für die 6-Phosphofruktokinase kodierenden Gens und/oder des für die 1-Phosphofruktokinase kodierenden Gens oder die katalytischen Eigenschaften der Genprodukte herabgesetzt oder ausgeschaltet werden. Gegebenenfalls werden beide Maßnahmen kombiniert. 55

[0029] Die Genexpression kann durch geeignete Kulturführung oder durch genetische Veränderung (Mutation) der Signalstrukturen der Genexpression verringert werden.

[0030] Signalstrukturen der Genexpression sind beispielsweise Repressorgene, Aktivatorgene, Operatoren, Promotoren, Attenuatoren, Ribosomenbindungsstellen, das Startkodon und Terminatoren. Angaben hierzu findet der Fachmann z. B. in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Boyd und Murphy (Journal of Bacteriology 170: 5949 (1988)), bei Voskuil und Chambliss (Nucleic Acids Research 26: 3548 (1998)), bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191 (1998)), bei Pátek et al. (Microbiology 142: 1297 (1996)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z. B. dem Lehrbuch von Knippers ("Molekulare Genetik", 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995) oder dem von Winnacker ("Gene und Klon", VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990). 60

[0031] Mutationen, die zu einer Veränderung bzw. Herabsetzung der katalytischen Eigenschaften von Enzymproteinen führen, sind aus dem Stand der Technik bekannt; als Beispiele seien die Arbeiten von Qiu und Goodman (Journal of Bio-

- logical Chemistry 272: 8611–8617 (1997)), Sugimoto et al. (Bioscience Biotechnology and Biochemistry 61: 1760–1762 (1997)) und Möckel ("Die Threonindehydratase aus *Corynebacterium glutamicum*: Aufhebung der allosterischen Regulation und Struktur des Enzyms", Berichte des Forschungszentrums Jülichs, Jül-2906, ISSN09442952, Jülich, Deutschland, 1994) genannt. Zusammenfassende Darstellungen können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z. B. dem von Hagemann ("Allgemeine Genetik", Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.
- 5 [0032] Als Mutationen kommen Transitionen, Transversionen, Insertionen und Deletionen in Betracht. In Abhängigkeit von der Wirkung des Aminosäureaustausches auf die Enzymaktivität wird von Fehlsinnmutationen ("missense mutations") oder Nichtsinnmutationen ("nonsense mutations") gesprochen. Insertionen oder Deletionen von mindestens einem Basenpaar in einem Gen führen zu Rasterverschiebungsmutationen ("frame shift mutations"), in deren Folge falsche
- 10 Aminosäuren eingebaut werden oder die Translation vorzeitig abbricht. Deletionen von mehreren Kodonen führen typischerweise zu einem vollständigen Ausfall der Enzymaktivität. Anleitungen zur Erzeugung derartiger Mutationen gehören zum Stand der Technik und können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z. B. dem Lehrbuch von Knippers ("Molekulare Genetik", 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995), dem von Winnacker ("Gene und Klone", VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990) oder dem von Hagemann
- 15 ("Allgemeine Genetik", Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.
- [0033] Eine gebräuchliche Methode, Gene von *C. glutamicum* zu mutieren, ist die von Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84–87 (1991)) beschriebene Methode der Gen-Unterbrechung ("gene disruption") und des Gen-Austauschs ("gene replacement").
- [0034] Bei der Methode der Gen-Unterbrechung wird ein zentraler Teil der Kodierregion des interessierenden Gens in
- 20 einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise *E. coli*), nicht aber in *C. glutamicum* replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784–791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69–73 (1994)), pK18mobsacB oder pK19mobsacB (Jäger et al., Journal of Bacteriology 174: 5462–65 (1992)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry 269: 32678–84; US-Patent 5,487,993), pCR®Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534–541 (1993)) oder pEM1 (Schrumpf et al. 1991, Journal of Bacteriology 173: 4510–4516) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zentrale Teil der Kodierregion des Gens enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm von *C. glutamicum* überführt. Die Methode der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756–759 (1994)) beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356–362 (1988)), Dunican und Shivnan (Bio/Technology 7, 1067–1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343–347 (1994)) beschrieben. Nach homologer Rekombination mittels eines
- 30 "cross-over"-Ereignisses wird die Kodierregion des betreffenden Gens durch die Vektorsequenz unterbrochen und man erhält zwei unvollständige Allele, denen jeweils das 3'- bzw. das 5'-Ende fehlt. Diese Methode wurde beispielsweise von Fitzpatrick et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 42, 575–580 (1994)) zur Ausschaltung des *recA*-Gens von
- 35 *C. glutamicum* verwendet.
- [0035] Bei der Methode des Genaustausches ("gene replacement") wird eine Mutation wie z. B. eine Deletion, Insertion oder Basenaustausch in dem interessierenden Gen in-vitro hergestellt. Das hergestellte Allel wird wiederum in einen für *C. glutamicum* nicht replikativen Vektor kloniert und dieser anschließend durch Transformation oder Konjugation in den gewünschten Wirt von *C. glutamicum* überführt. Nach homologer Rekombination mittels eines ersten, Integration
- 40 bewirkenden "cross-over"-Ereignisses und eines geeigneten zweiten, eine Exzision bewirkenden "cross-over"-Ereignisses im Zielgen bzw. in der Zielsequenz erreicht man den Einbau der Mutation bzw. des Allels. Diese Methode wurde beispielsweise von Peters-Wendisch et al. (Microbiology 144, 915–927 (1998)) verwendet, um das *pyc*-Gen von *C. glutamicum* durch eine Deletion auszuschalten.
- [0036] In das für die 6-Phosphofruktokinase kodierende Gen und/oder das für die 1-Phosphofruktokinase kodierende
- 45 Gen kann auf diese Weise eine Deletion, Insertion oder ein Basenaustausch eingebaut werden.
- [0037] Zusätzlich kann es für die Produktion von L-Aminosäuren vorteilhaft sein, zusätzlich zur Abschwächung des für die 6-Phosphofruktokinase kodierenden Gens und/oder des für die 1-Phosphofruktokinase kodierenden Gens, eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus, des Pentosephosphat-Zyklus, des Aminosäure-Exports und gegebenenfalls regulatorische Proteine zu verstärken, insbesondere überzuexprimieren.
- 50 [0038] Der Begriff "Verstärkung" bzw. "Verstärken" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme bzw. Proteine in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym bzw. Protein mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.
- 55 [0039] So kann für die Herstellung von L-Lysin neben der Abschwächung des für die 6-Phosphofruktokinase kodierenden Gens und/oder des für die 1-Phosphofruktokinase kodierenden Gens eines oder mehrere der Gene ausgewählt aus der Gruppe
- 60 – das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen *lysC* (Accession No.P26512, EP-B-0387527; EP-A-0699759; WO 00/63388),
 - das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende Gen *dapA* (EP-B 0 197 335),
 - das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen *gap* (Eikmanns (1992). Journal of Bacteriology 174: 6076–6086),
 - 65 – gleichzeitig das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen *pyc* (DE-A-198 31 609),
 - das für die Malat: Chinon Oxidoreduktase kodierende Gen *mgo* (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 254, 395–403 (1998)), (Abschwächung oder Verstärkung???)
 - das für die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen *zwf* (JP-A-09224661),

- gleichzeitig das für den Lysin-Export kodierende Gen *lysE* (DE-A-195 48 222),
- das für das *Zwa1*-Protein kodierende Gen *zwa1* (DE: 199 59 328.0, DSM 13115)
- das für die Triosephosphat Isomerase kodierende Gen *tpi* (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174: 6076-6086), und
- das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende Gen *pgk* (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174: 6076-6086), 5

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

[0040] Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, vorteilhaft sein, zusätzlich zur Abschwächung des für die 6-Phosphofruktokinase kodierenden Gens und/oder des für die 1-Phosphofruktokinase kodierenden Gens gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe 10

- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen *pck* (DE 199 50 409.1, DSM 13047),
- das für die Glucose-6-Phosphat-Isomerase kodierende Gen *pgi* (US 09/396,478, DSM 12969),
- das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen *poxB* (DE: 199 51 975.7, DSM 13114), 15
- das für die Fruktose-Bisphosphat Aldolase kodierende Gen *fda* (Mol. Microbiol. 3 (11), 1625-1637 (1989); Genbank Accession Number X17313) und
- das für das *Zwa2*-Protein kodierende Gen *zwa2* (DE: 199 59 327.2, DSM 13113)

abzuschwächen, insbesondere die Expression zu verringern. 20

[0041] Schließlich kann es für die Produktion von Aminosäuren, vorteilhaft sein, neben der Abschwächung des für die 6-Phosphofruktokinase kodierenden Gens und/oder des für die 1-Phosphofruktokinase kodierenden Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Micro-organisms", in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanz, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

[0042] Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung und können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von L-Aminosäuren kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bio-reaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben. 25 30

[0043] Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D. C., USA, 1981) enthalten.

[0044] Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z. B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z. B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z. B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z. B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z. B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden. 35

[0045] Als Stickstoffquelle können organische Stickstoffhaltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden. 40

[0046] Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z. B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wachstumsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden. 45

[0047] Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z. B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe wie z. B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoffhaltige Gasmischungen wie z. B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht. 50 55

[0048] Methoden zur Bestimmung von L-Aminosäuren sind aus dem Stand der Technik bekannt. Die Analyse kann so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben durch Anionenaustauschchromatographie mit anschließender Ninhydrin Derivatisierung erfolgen, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

[0049] Die vorliegende Erfindung wird im Folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert. 60

DE 101 12 992 A 1

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa AG

5 <120> Verfahren zur fermentativen Herstellung von
L-Aminosäuren unter Verwendung coryneformer Bakterien

<130> 010105 BT

10 <140>
<141>

<160> 4

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 2234
<212> DNA
20 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<221> CDS
25 <222> (632)..(1660)
<223> pfkA-Gen

<400> 1
cctctaataa gagtcgcccc gataagtttt ttaccgtaa ttattactgg gagtcagata 60
30 ctgcgtaagc aatcgcagca gcgccagcgg tcacagtaag aactgcaggc cacgcgccaa 120
tcttcttggc aagtgggtgg gacaggccaa atgcaccaac gtaggttgcc agcaggccag 180
35 tagctactgc aggacccttc ttttcattcc agcttcgtgc agcaagcgct ccggatgctg 240
ccaatggaat ggtgcccagt gggcgaatgc cggattcacg ggcagtcaac caaccgccga 300
40 tcaaacctgc tgcgacgacg gtggcagtgc tgacctggga tgcctttttc aatttcattt 360
ccatggtgag ccagtctaga gacaaaattt ttccgcgggg gttttcttga tctgatccga 420
caacccaatg ggggcaaaaa tgtgtccgac caaaaattgt gcagcacacc acatgcccgc 480
45 tcggacaatg tcgatttggt aatgaaactg cagctctggc gattaaataa gatggtcaga 540
gacagttttt tggcctgtca acccctgtga ttctcttatt tttgggtgat tgttccggcg 600
50 cgggtgttgt gatgggttta atatggaaga c atg cga att gct act ctc acg 652
Met Arg Ile Ala Thr Leu Thr
1 5

tca ggc ggc gac tgc ccc gga cta aac gcc gtc atc cga gga atc gtc 700
55 Ser Gly Gly Asp Cys Pro Gly Leu Asn Ala Val Ile Arg Gly Ile Val
10 15 20

cgc aca gcc agc aat gaa ttt ggc tcc acc gtc gtt ggt tat caa gac 748
60 Arg Thr Ala Ser Asn Glu Phe Gly Ser Thr Val Val Gly Tyr Gln Asp
25 30 35

65

DE 101 12 992 A 1

ggt tgg gaa gga ctg tta ggc gat cgt cgc gta cag ctg tat gac gat Gly Trp Glu Gly Leu Leu Gly Asp Arg Arg Val Gln Leu Tyr Asp Asp 40 45 50 55	796	
gaa gat att gac cga atc ctc ctt cga ggc ggc acc att ttg ggc act Glu Asp Ile Asp Arg Ile Leu Leu Arg Gly Gly Thr Ile Leu Gly Thr 60 65 70	844	5
ggt cgc ctc cat ccg gac aag ttt aag gcc gga att gat cag att aag Gly Arg Leu His Pro Asp Lys Phe Lys Ala Gly Ile Asp Gln Ile Lys 75 80 85	892	10
gcc aac tta gaa gac gcc ggc atc gat gcc ctt atc cca atc ggt ggc Ala Asn Leu Glu Asp Ala Gly Ile Asp Ala Leu Ile Pro Ile Gly Gly 90 95 100	940	15
gaa gga acc ctg aag ggt gcc aag tgg ctg tct gat aac ggt atc cct Glu Gly Thr Leu Lys Gly Ala Lys Trp Leu Ser Asp Asn Gly Ile Pro 105 110 115	988	20
gtt gtc ggt gtc cca aag acc att gac aat gac gtg aat ggc act gac Val Val Gly Val Pro Lys Thr Ile Asp Asn Asp Val Asn Gly Thr Asp 120 125 130 135	1036	25
ttc acc ttc ggt ttc gat act gct gtg gca gtg gct acc gac gct gtt Phe Thr Phe Gly Phe Asp Thr Ala Val Ala Val Ala Thr Asp Ala Val 140 145 150	1084	30
gac cgc ctg cac acc acc gct gaa tct cac aac cgt gtg atg atc gtg Asp Arg Leu His Thr Thr Ala Glu Ser His Asn Arg Val Met Ile Val 155 160 165	1132	35
gag gtc atg ggc cgc cac gtg ggt tgg att gct ctg cac gca ggt atg Glu Val Met Gly Arg His Val Gly Trp Ile Ala Leu His Ala Gly Met 170 175 180	1180	40
gcc ggc ggt gct cac tac acc gtt att cca gaa gta cct ttc gat att Ala Gly Gly Ala His Tyr Thr Val Ile Pro Glu Val Pro Phe Asp Ile 185 190 195	1228	45
gca gag atc tgc aag gcg atg gaa cgt cgc ttc cag atg ggc gag aag Ala Glu Ile Cys Lys Ala Met Glu Arg Arg Phe Gln Met Gly Glu Lys 200 205 210 215	1276	50
tac ggc att atc gtc gtt gcg gaa ggt gcg ttg cca cgc gaa ggc acc Tyr Gly Ile Ile Val Val Ala Glu Gly Ala Leu Pro Arg Glu Gly Thr 220 225 230	1324	55
atg gag ctt cgt gaa ggc cac att gac cag ttc ggt cac aag acc ttc Met Glu Leu Arg Glu Gly His Ile Asp Gln Phe Gly His Lys Thr Phe 235 240 245	1372	60
acg gga att gga cag cag atc gct gat gag atc cac gtg cgc ctc ggc Thr Gly Ile Gly Gln Gln Ile Ala Asp Glu Ile His Val Arg Leu Gly 250 255 260	1420	65
cac gat gtt cgt acg acc gtt ctt ggc cac att caa cgt ggt gga acc His Asp Val Arg Thr Thr Val Leu Gly His Ile Gln Arg Gly Gly Thr 265 270 275	1468	

DE 101 12 992 A 1

cca act gct ttc gac cgt gtt ctg gcc act cgt tat ggt gtt cgt gca 1516
 Pro Thr Ala Phe Asp Arg Val Leu Ala Thr Arg Tyr Gly Val Arg Ala
 280 285 290 295

5 gct cgt gcg tgc cat gag gga agc ttt gac aag gtt gtt gct ttg aag 1564
 Ala Arg Ala Cys His Glu Gly Ser Phe Asp Lys Val Val Ala Leu Lys
 300 305 310

10 ggt gag agc att gag atg atc acc ttt gaa gaa gca gtc gga acc ttg 1612
 Gly Glu Ser Ile Glu Met Ile Thr Phe Glu Glu Ala Val Gly Thr Leu
 315 320 325

15 aag gaa gtt cca ttc gaa cgc tgg gtt act gcc cag gca atg ttt gga 1660
 Lys Glu Val Pro Phe Glu Arg Trp Val Thr Ala Gln Ala Met Phe Gly
 330 335 340

tagtttttcg ggctttttatc aacagccaat aacagctctt tcgcccattg aggtggaggg 1720

20 gctgtttttt catgccgtaa ggaaagtgca agtaagtga atcaagtggc ctagatccat 1780

tgacacttag actgtgacct aggcttgact ttcgtggggg agtggggata agttcatctt 1840

25 aaacacaatg caatcgattg catttacgtt ccttatccca caataggggt accttccaga 1900

aagttggtga ggagatggct tccgaaacct ccagcccga gaagcggggc accacgctca 1960

30 aagacatcgc gcaagcaaca cagctttcag tcagcacggt gtcccgggca ttggccaaca 2020

acgcgagcat tccggaatcc acacgcatcc gagtggttga agccgctcaa aagctgaact 2080

accgtcccaa tgcccaagct cgtgcattgc ggaagtcgag gacagacacc atcgggtgtca 2140

35 tcattccaaa cattgagaac ccatatttct cctcactagc agcatcgatt caaaaagctg 2200

ctcgtgaagc tggggtgtcc accattttgt ccaa 2234

40 <210> 2
 <211> 343
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

45 <400> 2
 Met Arg Ile Ala Thr Leu Thr Ser Gly Gly Asp Cys Pro Gly Leu Asn
 1 5 10 15

50 Ala Val Ile Arg Gly Ile Val Arg Thr Ala Ser Asn Glu Phe Gly Ser
 20 25 30

Thr Val Val Gly Tyr Gln Asp Gly Trp Glu Gly Leu Leu Gly Asp Arg
 35 40 45

55 Arg Val Gln Leu Tyr Asp Asp Glu Asp Ile Asp Arg Ile Leu Leu Arg
 50 55 60

60 Gly Gly Thr Ile Leu Gly Thr Gly Arg Leu His Pro Asp Lys Phe Lys
 65 70 75 80

65

DE 101 12 992 A 1

Ala Gly Ile Asp Gln Ile Lys Ala Asn Leu Glu Asp Ala Gly Ile Asp	
85 90 95	
Ala Leu Ile Pro Ile Gly Gly Glu Gly Thr Leu Lys Gly Ala Lys Trp	5
100 105 110	
Leu Ser Asp Asn Gly Ile Pro Val Val Gly Val Pro Lys Thr Ile Asp	
115 120 125	10
Asn Asp Val Asn Gly Thr Asp Phe Thr Phe Gly Phe Asp Thr Ala Val	
130 135 140	
Ala Val Ala Thr Asp Ala Val Asp Arg Leu His Thr Thr Ala Glu Ser	15
145 150 155 160	
His Asn Arg Val Met Ile Val Glu Val Met Gly Arg His Val Gly Trp	
165 170 175	20
Ile Ala Leu His Ala Gly Met Ala Gly Gly Ala His Tyr Thr Val Ile	
180 185 190	
Pro Glu Val Pro Phe Asp Ile Ala Glu Ile Cys Lys Ala Met Glu Arg	25
195 200 205	
Arg Phe Gln Met Gly Glu Lys Tyr Gly Ile Ile Val Val Ala Glu Gly	
210 215 220	
Ala Leu Pro Arg Glu Gly Thr Met Glu Leu Arg Glu Gly His Ile Asp	30
225 230 235 240	
Gln Phe Gly His Lys Thr Phe Thr Gly Ile Gly Gln Gln Ile Ala Asp	
245 250 255	35
Glu Ile His Val Arg Leu Gly His Asp Val Arg Thr Thr Val Leu Gly	
260 265 270	
His Ile Gln Arg Gly Gly Thr Pro Thr Ala Phe Asp Arg Val Leu Ala	40
275 280 285	
Thr Arg Tyr Gly Val Arg Ala Ala Arg Ala Cys His Glu Gly Ser Phe	
290 295 300	45
Asp Lys Val Val Ala Leu Lys Gly Glu Ser Ile Glu Met Ile Thr Phe	
305 310 315 320	
Glu Glu Ala Val Gly Thr Leu Lys Glu Val Pro Phe Glu Arg Trp Val	50
325 330 335	
Thr Ala Gln Ala Met Phe Gly	
340	55
<210> 3	
<211> 2160	
<212> DNA	
<213> Corynebacterium glutamicum	60
<220>	
	65

DE 101 12 992 A 1

<221> CDS
<222> (609)..(1598)
<223> pfkB-Gen

5

<400> 3

cccatgggta cgtctccccc tcggctgaaa cctgccttgg ttaaaggaat gccaccggaa 60

ccccgtgttt tagaacttgc agaaactgca gttccctca tcacacctct agcacgcagc 120

10

attttcctgg attcaggttt agcgtgcacg gcgattgcca cggtgttggg ggatcctcca 180

gaagatgcca ggtggactgt tgttacaagt tccccggcg ctgtgattgc cttgtccgcg 240

15

acagatgcca cctccacggg ggtgctgcac gggcaggttc acggttaattg ttcttcaatc 300

attgggtcca cggcagtaga catgatttcg cagttgcgcg ctgatatcgc cttcgtggag 360

20

gttgatgcga ttcaatccga tacaagtctg tgcacgtttt tcccggagac gattcccatc 420

aagcaagcca tgatcaaaaa cgcggctttc acagttgctg ttctcagccc gagatctccc 480

caagatcaag aacttcaact tttgaagcac cttttttcca ctttggctga ttttgatgcc 540

25

cttgttaccg atgaccacac gctagatttt ccagttttgc ccgaccacaa ctttcaggtg 600

gtaacccc atg atc atc aca ttc acc cca aac ccg agt att gat tcc acg 650

Met Ile Ile Thr Phe Thr Pro Asn Pro Ser Ile Asp Ser Thr

30

1

5

10

ctg tcg ctc ggc gaa gag ctc tcc cgt gga tcc gtc caa cga ctt gat 698

Leu Ser Leu Gly Glu Glu Leu Ser Arg Gly Ser Val Gln Arg Leu Asp

15

20

25

30

35

tcc gtc acc gct gtc gca ggt ggt aaa ggc atc aat gtc gcc cac gct 746

Ser Val Thr Ala Val Ala Gly Gly Lys Gly Ile Asn Val Ala His Ala

35

40

45

40

gtc ttg ctt gcg ggc ttt gaa acc ttg gct gtg ttc cca gcc ggc aag 794

Val Leu Leu Ala Gly Phe Glu Thr Leu Ala Val Phe Pro Ala Gly Lys

50

55

60

45

ctc gac ccc ttc gtc cca ctg gtc cgc gac atc ggc ttg ccc gtg gaa 842

Leu Asp Pro Phe Val Pro Leu Val Arg Asp Ile Gly Leu Pro Val Glu

65

70

75

50

act gtt gtg atc aac aag aac gtc cgc acc aac acc aca gtc acc gaa 890

Thr Val Val Ile Asn Lys Asn Val Arg Thr Asn Thr Thr Val Thr Glu

80

85

90

55

ccg gac ggc acc acc acc aag ctc aac ggc ccc ggc gcg ccg ctc agc 938

Pro Asp Gly Thr Thr Thr Lys Leu Asn Gly Pro Gly Ala Pro Leu Ser

95

100

105

110

60

gag cag aag ctc cgt agc ttg gaa aag gtg ctt atc gac gcg ctc cgc 986

Glu Gln Lys Leu Arg Ser Leu Glu Lys Val Leu Ile Asp Ala Leu Arg

115

120

125

ccc gaa gtc acc tgg gtt gtc ctg gcg ggc tcg ctg cca cca ggg gca 1034

Pro Glu Val Thr Trp Val Val Leu Ala Gly Ser Leu Pro Pro Gly Ala

65

DE 101 12 992 A 1

130	135	140		
cca gtt gac tgg tac gcg cgt ctc acc gcg ttg atc cat tca gca cgc Pro Val Asp Trp Tyr Ala Arg Leu Thr Ala Leu Ile His Ser Ala Arg 145 150 155	1082		5	
cct gac gtt cgc gtg gct gtc gat acc tca gac aag cca ctg atg gcg Pro Asp Val Arg Val Ala Val Asp Thr Ser Asp Lys Pro Leu Met Ala 160 165 170	1130		10	
ttg ggc gag agc ttg gat aca cct ggc gct gct ccg aac ctg att aag Leu Gly Glu Ser Leu Asp Thr Pro Gly Ala Ala Pro Asn Leu Ile Lys 175 180 185 190	1178		15	
cca aat ggt ctg gaa ctg ggc cag ctg gct aac act gat ggt gaa gag Pro Asn Gly Leu Glu Leu Gly Gln Leu Ala Asn Thr Asp Gly Glu Glu 195 200 205	1226		20	
ctg gag gcg cgt gct gcg caa ggc gat tac gac gcc atc atc gca gct Leu Glu Ala Arg Ala Ala Gln Gly Asp Tyr Asp Ala Ile Ile Ala Ala 210 215 220	1274		25	
gcg gac gta ctg gtt aac cgt ggc atc gaa cag gtg ctt gtc acc ttg Ala Asp Val Leu Val Asn Arg Gly Ile Glu Gln Val Leu Val Thr Leu 225 230 235	1322		30	
ggt gcc gca gga gcg gtg ttg gtc aac gca gaa ggt gcg tgg act gct Gly Ala Ala Gly Ala Val Leu Val Asn Ala Glu Gly Ala Trp Thr Ala 240 245 250	1370		35	
act tct cca aag att gat gtt gta tcc acc gtt gga gct gga gac tgt Thr Ser Pro Lys Ile Asp Val Val Ser Thr Val Gly Ala Gly Asp Cys 255 260 265 270	1418		40	
gct ctt gca ggt ttt gtt atg gca cgt tcc cag aag aaa aca ctg gag Ala Leu Ala Gly Phe Val Met Ala Arg Ser Gln Lys Lys Thr Leu Glu 275 280 285	1466		45	
gaa tct ctg ctg aat gcc gtg tct tac ggc tcg act gcg gcg tct ctt Glu Ser Leu Leu Asn Ala Val Ser Tyr Gly Ser Thr Ala Ala Ser Leu 290 295 300	1514		50	
cct ggc act acc att cct cgt cct gac caa ctc gcc aca gct ggt gca Pro Gly Thr Thr Ile Pro Arg Pro Asp Gln Leu Ala Thr Ala Gly Ala 305 310 315	1562		55	
acg gtc acc caa gtc aaa gga ttg aaa gaa tca gca tgaatagcgt Thr Val Thr Gln Val Lys Gly Leu Lys Glu Ser Ala 320 325 330	1608		60	
aaataattcc tcgcttggtcc ggctggatgt cgatttcggc gactccacca cggatgtcat	1668		65	
caacaacctt gccactgtta ttttcgacgc tggccgagct tcctccgccg acgcccttgc	1728			
caaagacgcg ctggatcgtg aagcaaagtc cggcaccggc gttcctggtc aagttgctat	1788			
ccccactgc cgttccgaag ccgtatctgt ccctaccttg ggctttgctc gcctgagcaa	1848			
gggtgtggac ttcagcggac ctgatggcga tgccaacttg gtgttcctca ttgcagcacc	1908			

DE 101 12 992 A 1

tgctggcggc ggcaaagagc acctgaagat cctgtccaag cttgctcgct ccttggtgaa 1968
gaaggatttc atcaaggctc tgcaggaagc caccaccgag caggaaatcg tcgacgttgt 2028
5 cgatgccgtg ctcaaccacg caccaaaaac caccgagcca gctgcagctc cggctgcggc 2088
ggcggttgct gagagtgggg cggcgtcgac aagcgttact cgtatcgtgg caatcaccgc 2148
10 atgccaacc gg 2160

<210> 4
<211> 330
15 <212> PRT
<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 4
20 Met Ile Ile Thr Phe Thr Pro Asn Pro Ser Ile Asp Ser Thr Leu Ser
1 5 10 15
Leu Gly Glu Glu Leu Ser Arg Gly Ser Val Gln Arg Leu Asp Ser Val
20 25 30
25 Thr Ala Val Ala Gly Gly Lys Gly Ile Asn Val Ala His Ala Val Leu
35 40 45
Leu Ala Gly Phe Glu Thr Leu Ala Val Phe Pro Ala Gly Lys Leu Asp
30 50 55 60
Pro Phe Val Pro Leu Val Arg Asp Ile Gly Leu Pro Val Glu Thr Val
65 70 75 80
35 Val Ile Asn Lys Asn Val Arg Thr Asn Thr Thr Val Thr Glu Pro Asp
85 90 95
Gly Thr Thr Thr Lys Leu Asn Gly Pro Gly Ala Pro Leu Ser Glu Gln
40 100 105 110
Lys Leu Arg Ser Leu Glu Lys Val Leu Ile Asp Ala Leu Arg Pro Glu
115 120 125
45 Val Thr Trp Val Val Leu Ala Gly Ser Leu Pro Pro Gly Ala Pro Val
130 135 140
Asp Trp Tyr Ala Arg Leu Thr Ala Leu Ile His Ser Ala Arg Pro Asp
145 150 155 160
50 Val Arg Val Ala Val Asp Thr Ser Asp Lys Pro Leu Met Ala Leu Gly
165 170 175
Glu Ser Leu Asp Thr Pro Gly Ala Ala Pro Asn Leu Ile Lys Pro Asn
55 180 185 190
Gly Leu Glu Leu Gly Gln Leu Ala Asn Thr Asp Gly Glu Glu Leu Glu
195 200 205
60 Ala Arg Ala Ala Gln Gly Asp Tyr Asp Ala Ile Ile Ala Ala Ala Asp
210 215 220

65

Val	Leu	Val	Asn	Arg	Gly	Ile	Glu	Gln	Val	Leu	Val	Thr	Leu	Gly	Ala		
225					230					235					240		
Ala	Gly	Ala	Val	Leu	Val	Asn	Ala	Glu	Gly	Ala	Trp	Thr	Ala	Thr	Ser		5
				245					250					255			
Pro	Lys	Ile	Asp	Val	Val	Ser	Thr	Val	Gly	Ala	Gly	Asp	Cys	Ala	Leu		
			260					265					270				10
Ala	Gly	Phe	Val	Met	Ala	Arg	Ser	Gln	Lys	Lys	Thr	Leu	Glu	Glu	Ser		
		275					280					285					
Leu	Leu	Asn	Ala	Val	Ser	Tyr	Gly	Ser	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Pro	Gly		15
	290					295					300						
Thr	Thr	Ile	Pro	Arg	Pro	Asp	Gln	Leu	Ala	Thr	Ala	Gly	Ala	Thr	Val		
305					310					315					320		
Thr	Gln	Val	Lys	Gly	Leu	Lys	Glu	Ser	Ala								20
				325					330								

Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend verlängerte für die 1-Phosphofruktokinase und/oder 6-Phosphofruktokinase kodierende Polynukleotidsequenzen, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie jeweils vor dem Startkodon und hinter dem Stopkodon des Gens jeweils um bis zu ca. 700 Basenpaaren verlängert sind. 25
2. Isoliertes Polynukleotid gemäß Anspruch 1, enthaltend eine für die 1-Phosphofruktokinase und/oder 6-Phosphofruktokinase kodierende Polynukleotidsequenz, dadurch gekennzeichnet, daß sie vor dem Startkodon und hinter dem Stopkodon des Gens jeweils um bis zu ca. 700 Basenpaare verlängert sind, wobei die verlängerten Aminosäuresequenzen für das 1-Phosphofruktokinase-Gen in SEQ ID No. 3 und für das 6-Phosphofruktokinase-Gen in SEQ ID No. 1 dargestellt sind und die Verlängerungen gegenüber den aus dem Stand der Technik bekannten Sequenzen in SEQ ID No. 3 aus den Basenpaaren 1 bis 508 bzw. 1684 bis 2234 und in SEQ ID No. 1 aus den Basenpaaren 1 bis 531 bzw. 1621 bis 2160 bestehen. 30
3. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, dadurch gekennzeichnet, daß man folgende Schritte durchführt, 35
 - a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden coryneformen Bakterien, in denen man zumindest das für die 6-Phosphofruktokinase kodierende Gen und/oder das für die 1-Phosphofruktokinase kodierende Gen abschwächt, 40
 - b) Anreicherung des gewünschten Produkts im Medium oder in den Zellen der Bakterien, und
 - c) Isolierung der gewünschten L-Aminosäure, wobei gegebenenfalls Bestandteile der Fermentationsbrühe und/oder Biomasse in Anteilen oder in ihren Gesamtmengen im Endprodukt verbleiben.
4. Verfahren gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß man coryneforme Bakterien einsetzt, in denen man die Abschwächung unter Verwendung der Polynukleotidsequenzen erzielt, die vor dem Startkodon und hinter dem Stopkodon des jeweiligen Gens um jeweils 300 bis 800 Basenpaare verlängert sind. 45
5. Verfahren gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß man coryneforme Bakterien einsetzt, in denen man die Abschwächung unter Verwendung der Polynukleotidsequenzen erzielt, die vor dem Startkodon und hinter dem Stopkodon des Gens jeweils um ca. 700 Basenpaare verlängert sind, wobei die verlängerten Nukleotidsequenzen für das 1-Phosphofruktokinase-Gen in SEQ ID No. 3 und für das 6-Phosphofruktokinase-Gen in SEQ ID No. 1 dargestellt sind und die Verlängerungen in SEQ ID No. 3 gegenüber der aus dem Stand der Technik bekannten Sequenz aus den Basenpaaren 1 bis 508 bzw. 1684 bis 2234 und in SEQ ID No. 1 gegenüber der aus dem Stand der Technik bekannten Sequenz aus den Basenpaaren 1 bis 531 bzw. 1621 bis 2160 bestehen. 50
6. Verfahren gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß man Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt. 55
7. Verfahren gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß man Bakterien einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure verringern.
8. Verfahren gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß man die Expression des (der) Polynuklotides (e), das (die) für die 6-Phosphofruktokinase und/oder für die 1-Phosphofruktokinase kodiert (en), verringert.
9. Verfahren gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß man die katalytischen Eigenschaften des (der) Polypeptid(s)e (Enzymprotein(s)e) verringert, für das das (die) Polynukleotid(e) aus SEQ ID NO. 1 bzw. SEQ ID No. 3 kodieren. 60
10. Verfahren gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß man für die Herstellung von L-Lysin coryneforme Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
 - 10.1 das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC, 65
 - 10.2 das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende Gen dapA,
 - 10.3 das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen gap,
 - 10.4 das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen pyc,



- 10.5 das für die Malat: Chinon Oxidoreduktase kodierende Gen mgo,
10.6 das für die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen zwf,
10.7 gleichzeitig das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE,
10.8 das für das Zwa1-Protein kodierende Gen zwa1
5 10.9 das für die Triosephosphat Isomerase kodierende Gen tpi, und
10.10 das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende Gen pgk,
verstärkt insbesondere überexprimiert.
11. Verfahren gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren coryne-
forme Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der
10 Gruppe
11.1 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende pck-Gen,
11.2 das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende pgi-Gen
11.3 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB,
11.4 das für die Fruktose-Bisphosphat Aldolase kodierende Gen fda oder
15 11.5 das für das Zwa2-Protein kodierende Gen zwa2
abschwächt.
12. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man Mi-
kroorganismen der Art *Corynebacterium glutamicum* einsetzt.
13. Coryneforme Bakterien, in denen zumindest das für die 6-Phosphofruktokinase kodierende Gen und/oder das
20 für die 1-Phosphofruktokinase kodierende Gen abgeschwächt vorliegt.

25

30

35

40

45

50

55

60

65